

**DISEASE-RESISTANT PLANTS AND METHOD OF CONSTRUCTING THE SAME****Publication number:** WO0219803**Publication date:** 2002-03-14**Inventor:** TAKAKURA YOSHIMITSU (JP); INOUE YASUHIRO (JP); KUWATA SHIGERU (JP); TSUTSUMI FUMIKI (JP); ISHIDA YUJI (JP)**Applicant:** JAPAN TOBACCO INC (JP); SYNGENTA LTD (GB); TAKAKURA YOSHIMITSU (JP); INOUE YASUHIRO (JP); KUWATA SHIGERU (JP); TSUTSUMI FUMIKI (JP); ISHIDA YUJI (JP)**Classification:****- international:** C07K14/21; C12N15/82; C07K14/195; C12N15/82; (IPC1-7): A01H5/00; C12N15/09**- European:** C07K14/21; C12N15/82C8B6B**Application number:** WO2001JP07785 20010907**Priority number(s):** JP20000271413 20000907**Also published as:**

EP1316252 (A1)  
 US2004073970 (A1)  
 CN1471356 (A)  
 CA2421386 (A1)  
 AU2001284482B (B2)

**Cited documents:**

WO9636697  
 WO9426782

**Report a data error here****Abstract of WO0219803**

It is intended to provide disease-resistant plants which have been transformed so as to induce an adequate defensive reaction and a method of constructing the same. An expression cassette containing a promoter, which is capable of constitutionally, inductively, organ-specifically or time-specifically expressing a gene, and a gene encoding an elicitor protein regulated by the above promoter.

Construct name	Inducible/Constitutive	Construct of the cassette	Plant which has been transformed
PALL1- <i>hsp2</i>	Inducible	PALL1 <i>pro</i> <i>hsp2</i>	Tobacco
PAL15- <i>hsp2</i>	Inducible	PAL15 <i>pro</i> <i>hsp2</i>	Tobacco
35S- <i>hsp2</i>	Constitutive	35S <i>pro</i> <i>hsp2</i>	Rice, Tobacco
PP2K- <i>hsp2</i>	Constitutive	PP2K <i>pro</i> <i>hsp2</i>	Rice, Tobacco

図表に記入したコンストラクト  
 CONSTRUCT INFORMATION TABLE

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002 年 3 月 14 日 (14.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/19803 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A01H 5/00, C12N 15/09 郡豊田町東原700番地 株式会社 オリノバ内 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/07785
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 7 日 (07.09.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-271413 2000 年 9 月 7 日 (07.09.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP). シンジェンタ リミテッド (SYNGENTA LIMITED) [GB/GB]; GU27 3JE サリー ヘーゼルミア ファーン ハースト Surrey (GB).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高倉由光 (TAKAKURA, Yoshimitsu) [JP/JP]. 井上康宏 (INOUE, Yasuhiro) [JP/JP]. 桑田 茂 (KUWATA, Shigeru) [JP/JP]. 堤 史樹 (TSUTSUMI, Fumiki) [JP/JP]. 石田 祐二 (ISHIDA, Yuji) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田
- (74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DISEASE-RESISTANT PLANTS AND METHOD OF CONSTRUCTING THE SAME

(54) 発明の名称: 病害抵抗性植物及びその作出方法

Construct name	Inducible/Constitutive	Contents of the construct	Plants which the construct was introduced
PALL-hrpZ	Inducible	PAL1.45 pro → hrpZ	Tobacco
PALS-hrpZ	Inducible	PAL0.45 pro → hrpZ	Tobacco
35S-hrpZ	Constitutive	35S pro → hrpZ	Rice, Tobacco
PPDK-hrpZ	Constitutive	PPDK pro → hrpZ	Rice, Tobacco

植物に導入したコンストラクト  
CONSTRUCT INTRODUCED INTO PLANT

(57) Abstract: It is intended to provide disease-resistant plants which have been transformed so as to induce an adequate defensive reaction and a method of constructing the same. An expression cassette containing a promoter, which is capable of constitutively, inductively, organ-specifically or time-specifically expressing a gene, and a gene encoding an elicitor protein regulated by the above promoter.

[続葉有]



---

(57) 要約:

適切な防御反応を引き起こすように形質転換された病害抵抗性を有する植物、及びその作出方法を提供することを課題とする。

本発明は、構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーター及び該プロモーターにより制御されるエリシタータンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを提供する。

## 明 細 書

## 病害抵抗性植物及びその作出方法

## 5 技術分野

本発明は、病原体に抵抗性の植物を作出する方法、病原体に抵抗性の植物を作出する遺伝子発現カセット及びそれらにより作出された病害抵抗性形質転換植物に関するものである。

## 10 背景技術

植物は、動物に見られるような免疫機構を保有していないが、植物に特有の機構で自らを病原体から防御している。高等植物の過敏感反応（hypersensitive response, HR）は、感染部位の植物細胞が速やかに自殺し病原体を局所的に封じ込めるといふ、病原体侵入に対する植物側の動的な抵抗性反応である。この反応は、非親和的な宿主－病原体相互作用、及び非宿主－病原体相互作用の結果として生じることが知られている。またここに見られる細胞の自殺は局所的なプログラム細胞死として捉えることが出来る（Dangl et al. : Plant Cell 8 : 1793-1807 (1996)）。HR を引き起こす機構に加え、活性酸素種の生成、細胞壁の強化、ファイトアレキシンの生産、PR タンパク質などの防御関連タンパク質の合成といった、他の防御反応も誘導される（Hammond-Kosack and Jones : Plant Cell 8 : 1773-1791 (1996)）。この様な局所的な防御応答に加えて、多くの場合、植物の非感染部分にも PR タンパク質の蓄積などの防御反応が拡大し、結果として植物全体が抵抗性になる。これは全身獲得抵抗性（systemic acquired resistance, SAR）と呼ばれ、数週間又はそれ以上持続し、植物全体が二次感染に対して抵抗性となる（Sticher et al. : Annu Rev Phytopathol 35 : 235-270 (1997)）。

以上のような高度に組織化された防御反応のスイッチをオンにする植物側の最初の反応は、侵入病原体から直接、あるいは間接的に生成される「エリシター」

と呼ばれる分子の認識である。そしてその後の急激な活性酸素種の生成や、可逆的なタンパク質リン酸化といった複雑なシグナルカスケードが防御応答の初期反応として重要であると考えられている (Yang et al. : Genes Dev 11 : 1621-1639 (1997))。エリシターの種類は多岐に渡っており、多くの菌類の細胞壁成分であるキチン・キトサンやグルカンの分解産物であるオリゴ糖類、あるいは植物の細胞壁由来のオリゴガラクトuron酸などの、いわゆる非特異的エリシターと、AVR9 など病原菌側の非病原性遺伝子産物 (Avr 遺伝子産物) などの品種特異的なエリシター、あるいはエリシチンなどその中間の特異性をもつタイプのエリシターがある (Boller : Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46 : 189-214 (1995))。

Harpin は、非宿主植物に過敏感細胞死を誘導する細菌由来のタンパク質性エリシターである (Wei et al. : Science 257 : 85-88 (1992)、He et al. : Cell 73 : 1255-1266 (1993))。Harpin ( $\text{harpin}_{\text{Ea}}$ ) は、セイヨウナシやリンゴの病原菌である *Erwinia amylovora* Ea321 株、及びその hrp 遺伝子クラスターを含むコスミドで形質転換された大腸菌から、細菌由来の最初の HR 誘導性タンパク質として精製され、それをコードする hrpN 遺伝子もクローニングされた (Wei et al. : Science 257 : 85-88 (1992))。その後マメの病原菌である *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 株からも、大腸菌発現ライブラリーのタバコ葉に HR を誘導する活性を指標としたスクリーニングにより、hrpZ 遺伝子にコードされた  $\text{harpin}_{\text{psa}}$  が同定、特徴づけされた (He et al. : Cell 73 : 1255-1266 (1993)、及び特表平 8-510127)。これら 2 つの harpin の相同性は低く、22 アミノ酸に比較的高い相同性が見られるにすぎない。また harpin の病原性における役割は分かっていない。これらの他に第 3 のタンパクとしてトマトの病原菌である *Pseudomonas solanacearum* GMI1000 株から、非宿主であるタバコに HR を誘導するタンパク質として PopA タンパク (PopA にコードされている) が同定されている (Arlat et al. : EMBO J 13 : 543-553 (1994))。PopA 遺伝子は hrpN や hrpZ とは異なり hrp クラスターの外側に位置しているが、hrp レギュロンの制御下にある点が一致している。以上 3 つのタンパク質は、

グリシンリッチで、熱に安定なタンパク質で、非宿主であるタバコに HR を誘導し、少なくとも in vitro で Hrp タンパク質依存的に細胞外に分泌される。なおこれらの他に、同様な機能を有するタンパクとして *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 株から HrpW タンパク (Charkowski et al. : J Bacteriol 180 : 5211-5217 (1998)) が、また harpin<sub>ps</sub> ホモログとして、HrpZ<sub>pst</sub>、HrpZ<sub>psg</sub> タンパク質 (Preston et al. : Mol Plant-Microbe Interact 8 : 717-732 (1995)) が、harpin<sub>Ea</sub> ホモログとして harpin<sub>Ech</sub> (Bauer et al. : Mol Plant-Microbe Interact 8 : 484-491 (1995)) や HrpN<sub>Ecc</sub> タンパク (Cui et al. : Mol Plant-Microbe Interact 9 : 565-573 (1996)) がそれぞれ報告されている。

10

Harpin による局部壊死斑形成は、harpin の細胞毒性によるいわゆる necrosis ではなく、植物側の積極的な応答の結果としての細胞死であることが各種代謝阻害剤研究から明らかとなっており (He et al. : Mol Plant-Microbe Interact 7 : 289-292 (1994)、及び He et al. : Cell 73 : 1255-1266 (1993))、この過敏細胞死は、プログラム細胞死の一つであると考えられている (Desikan et al. : Biochem J 330 : 115-120 (1998))。Harpin<sub>ps</sub> をアラビドプシス培養細胞に加えると、病害抵抗性反応の初期反応として重要なオキシダティブバーストを担うと考えられている NADPH オキシダーゼの一構成要素である gp91-phox のホモログ (J Exp Bot 49 : 1767-1771 (1998)) や、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ (Desikan et al. : Planta 210 : 97-103 (1999)) を誘導する。さらに harpin は植物に全身獲得抵抗性 (SAR) を付与することができる。例えば、harpin<sub>Ea</sub> を植物細胞に人工的に注入することにより、サリチル酸や NIM 遺伝子を介する SAR をアラビドプシス植物に誘導することができ (Dong et al. : The Plant J. 20 : 207-215 (1999))、また harpin<sub>ps</sub> は、キュウリに SAR を誘導し、菌類、ウイルス、細菌に対し広いスペクトラムの抵抗性を付与することができる (Strobel et al. : Plant J 9 : 431-439 (1996))。

20

25

このように、これまで精製 harpin を植物に人工的に注入又は噴霧し、過敏細胞死や、獲得抵抗性反応の誘導を解析した報告例は存在する (特表平 11-

506938、Strobel et al. : Plant J 9 : 431-439 (1996)、及び Dong et al. : The Plant J. 20 : 207-215 (1999))。しかしながら、harpin 等のエリシタータンパク質をコードする遺伝子を植物に導入し、形質転換植物を作出し、そしてそれを解析した例は未だ報告されていない。

5

#### 発明の概要

harpin 等のエリシタータンパク質をコードする遺伝子を導入されると、植物は、病原の存在しない通常の状態であっても一定量以上のエリシタータンパク質を発現してしまい、あるいは、病害に侵された器官以外の器官で一定量以上のエリシタータンパク質を発現してしまい、結果、意図しない種々の反応が生じて正常に生育できないと予想された。本発明は、適切な防御反応を引き起こすように形質転換された病害抵抗性を有する植物、及びその作出方法を提供することを課題とする。

15 本発明者らは、鋭意研究を行った結果、*Pseudomonas syringae* pv *syringae* LOB2-1 株の hrpZ 遺伝子を導入した形質転換タバコが、うどんこ病菌 (*Erysiphe cichoracearum*) 接種に対して過敏感反応様の局部壊死斑を生じ抵抗性になることを発見し、本発明を完成した。驚くべきことに、細胞死を誘導する harpin を、全身の細胞で発現するような構成的プロモーター (カリフラワー

20 モザイクウイルス 35SRNA 遺伝子プロモーター) を用いて発現させても、植物は正常に生育した。しかも過敏感細胞死様の反応は病原菌の接種以降にのみ誘導された。さらに本発明者らは、同 hrpZ 遺伝子を導入した形質転換イネがイネいもち病 (*Magnaporthe grisea*) に抵抗性になることを見出し、本アプローチの汎用性を示した。

25

本発明は、構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーター及び該プロモーターにより制御されるエリシタータンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを用いて形質転換され、防御反応を誘導するために有効な量のエリシタータンパク質を、構成的、誘導的、器官特

異的又は時期特異的に発現しうる、病害抵抗性形質転換植物を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明で構築、植物へ導入したコンストラクトを示す。

- 5 図 2 は、 $T_0$  世代の形質転換タバコ、イネにおけるウェスタン分析による  $\text{harpin}_{\text{psb}}$  蓄積の検出例を示す写真である。PC は対照とした大腸菌発現  $\text{harpin}_{\text{psb}}$  を示す。

図 3 は、 $T_1$  世代の形質転換タバコに生じた局部壊死斑の様相を示す写真である。

- 10 A : PALL-hrpZ 導入個体 (接種 5 日目、 $\text{harpin}$  発現量 : ++)、B : 35S-hrpZ 導入個体 (接種 7 日目、 $\text{harpin}$  発現量 : ++)

図 4 は、 $T_1$  世代の形質転換タバコのうどんこ病抵抗性を示す写真である (右 : 35S-hrpZ 導入個体、 $\text{harpin}$  発現量 : ++。左 : 対照の SR1。ともに接種 11 日目)。

15

#### 発明の開示

- 本発明はまた、防御反応を誘導するために有効な量のエリシタータンパク質を、構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に発現しうる、病害抵抗性形質転換植物の作出方法をも提供する。この方法は：(a) 構成的、誘導的、器官特異的
- 20 又は時期特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーター及び該プロモーターにより制御されるエリシタータンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを用いて、組換え植物細胞を得る工程；並びに (b) 該植物細胞を植物体に再生させる工程を含む。

- 25 本発明はまた、病害抵抗性形質転換植物の作出のために用いうる、発現カセットをも提供する。この発現カセットは少なくとも：(a) 構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーター；及び (b) 該プロモーターにより制御されるエリシタータンパク質をコードする遺伝子を含む。



エリシターとは、植物に防御反応を引き起こさせる物質の総称であり、タンパク質の他、重金属イオン、病原菌や植物の細胞壁成分等を含む。本明細書でエリシターというときは、特別な場合の除き、たんぱく質性のエリシターを意味する。

5

本発明でいうエリシタータンパク質は、形質転換しようとする植物において適切な防御反応を引き起こすことができるタンパク質であればよく、好ましくは病害微生物に対する過敏感反応を誘導する活性を有するタンパク質である。これには harpin 及び harpin と同様の機能を有する harpin 様タンパク質が含まれる。

- 10 harpin は、タイプⅢ分泌機構により hrp 遺伝子依存的に植物へ注入されることが想定されているタンパク質であり、例えば、harpin<sub>psa</sub> (He et al. : Cell 73 : 1255-1266 (1993) 、及び特表平 8-510127) 以外にも、harpin<sub>Ea</sub> (Wei et al. : Science 257 : 85-88 (1992) 、及び特表平 11-506938) 、PopA (Arlat et al. : EMBO J 13 : 543-553 (1994) ) 、hrpW タンパク質 (Charkowski et al. : J Bacteriol 180 : 5211-5217 (1998) ) が含まれる。そして、過敏感反応を誘導する活性を有するタンパク質は、例えば (a) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質 ; (b) 配列表の配列番号 2 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質 ; 又は (c) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 50% 以上 (好ましくは、80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 97% 以上) の相同性を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質であってもよい。配列番号 2 に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質は新規である。したがって本発明は、次のいずれかのタンパク質 : (a) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質 ; (b) 配列表の配列番号 2 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質 ; 又は (c) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 以上の相同性を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質をも提供する (ただし、本発明の範囲からは、公知のタンパク質自体は除かれる) 。

- 本明細書でアミノ酸配列について「相同」というときは、比較される配列間において、各々の配列を構成するアミノ酸残基の一致の程度の意味で用いている。このとき、ギャップの存在及びアミノ酸の性質が考慮される (Wilbur, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 726-730 (1983) 等)。相同性の計算には、市販のソフトである BLAST (Altschul : J. Mol. Biol. 215 : 403-410 (1990) )、FASTA (Pearson : Methods in Enzymology 183 : 63-69 (1990) ) 等を用いることができる。
- 5
- 10 また本明細書でアミノ酸配列について「1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入」というときは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、又は天然に生じうる程度の数のアミノ酸が置換等されていることを意味する。数個は、例えば 10 個以下、好ましくは 3~5 個以下である。
- 15 本発明の発現カセットに用いられるエリシタータンパク質をコードする遺伝子は、当業者によく知られた方法により容易に単離することができる。
- エリシタータンパク質をコードする遺伝子は、例えば (a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA ; (b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ過
- 20 敏感反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA ; (c) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA ; 又は
- 25 (d) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と少なくとも 50% 以上 (好ましくは、80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 97% 以上) の相同性を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA であってもよい。配列番号 1 に記載された塩基配列を有する DNA は新規である。したがって本発明は、次のいずれかの DNA からな

る遺伝子：(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA；(b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA；(c) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA；又は (d) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と少なくとも 50% 以上の相同性を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA をも提供する（ただし、本発明の範囲からは、*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 株の *hrpZ* 遺伝子等の公知の遺伝子自体は除かれる）。なお、塩基配列に関する相同性の計算には、市販のソフトを用いることができる。

本明細書で塩基配列について「1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加又は挿入」というときは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、又は天然に生じる程度の数の塩基が置換等されていることを意味する。数個は、例えば 10 個以下、好ましくは 3～5 個以下である。本明細書でいうストリンジェントな条件とは、温度約 40℃ 以上、塩濃度約 6×SSC（1×SSC=15mM クエン酸ナトリウム緩衝液；pH7.0；0.15M 塩化ナトリウム；0.1% SDS）、好ましくは約 50℃ 以上、更に好ましくは約 65℃ 以上でのハイブリダイズ条件をいう。

本発明に用いられるプロモーターは、形質転換すべき植物においてエリシタータンパク質をコードする遺伝子のプロモーターとして機能することのできるものであればよい。本発明には、構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に遺伝子を発現させるプロモーターを用いることができる。

構成的に遺伝子を発現させるプロモーター（「構成的プロモーター」ということもある。）とは、遺伝子の転写に関し、器官特異性及び／又は時期特異性が高

くないものをいう。構成的プロモーターには、例えば、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、ユビキチンプロモーター (Cornejo et al. : Plant Mol Biol 23 : 567-581 (1993))、アクチンプロモーター (McElroy et al. : Plant Cell 2 : 163-171 (1990))、アルファチューブリンプロモーター  
5 (Carpenter et al. : Plant Mol Biol 21 : 937-942 (1993))、Sc プロモーター (Schenk et al. : Plant Mol Biol 39 : 1221-1230 (1999)) 等が含まれる。形質転換された植物において、エリシタータンパク質を構成的に発現させるような発現力セットは、例えば構成的プロモーターとして知られる既知のプロモーターを含むものである。

10

誘導的に遺伝子を発現させるプロモーター (「誘導的プロモーター」ということもある。) とは、光、病害、障害、エリシターとの接触等の物理的又は化学的刺激により転写誘導のかかるプロモーターをいう。誘導的プロモーターには、例えば、エンドウ PAL プロモーター、Prp1 プロモーター (特表平 10-500312)、  
15 hsr203J プロモーター (Pontier et al. : Plant J 5 : 507-521 (1994))、EAS4 プロモーター (Yin et al. : Plant Physiol 115 : 437-451 (1997))、PR1b1 プロモーター (Tornerio et al. : Mol Plant Microbe Interact 10 : 624-634 (1997))、tap1 プロモーター (Mohan et al. : Plant Mol Biol 22 : 475-490 (1993))、AoPR1 プロモーター (Warner et al. : Plant J 3 : 191-201 (1993)) 等が含ま  
20 れる。形質転換された植物において、エリシタータンパク質を誘導的に発現させる発現力セットは、例えば、誘導的プロモーターとして知られる既知のプロモーターを含むものである。

器官特異的に遺伝子を発現させるプロモーター (「器官特異的プロモーター」ということもある。) とは、遺伝子の転写に、葉、根、茎、花、雄蕊、雌蕊等の器官的な特異性を与えるものをいう。器官特異的プロモーターには、例えば、PPDK (Matsuoka et al. : Proc Natl Acad Sci USA 90 : 9586-9590 (1993)) や PEPC (Yanagisawa and Izui : J Biochem 106 : 982-987 (1989)、及び  
25 Matsuoka et al. : Plant J 6 : 311-319 (1994))、Rubisco (Matsuoka et al. :

Plant J 6 : 311-319 (1994)) といった光合成関連遺伝子の緑色器官で遺伝子を高発現させるようなプロモーター等が含まれる。形質転換された植物において、エリシタータンパク質を器官特異的に発現させる発現カセットは、例えば器官特異的プロモーターとして知られる既知のプロモーターを含むものである。

5

時期特異的に遺伝子を発現させるプロモーター（「時期特異的プロモーター」ということもある。）とは、転写に生育初期、中期、後期など時期的な特異性を与えるものをいう。時期特異的プロモーターには、例えば、SAG12 プロモーター（Gan and Amasino : Science 270 : 1986-1988 (1985)）といった老化葉で

10 特異的に発現するプロモーターなどが含まれる。

本発明の発現カセットの構成要素となる各 DNA 断片をサブクローニングするためのベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（プラスミド DNA）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターとしては、具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして、例えば、pBluescript、pUC18、pUC19、pBR322 などが例示されるがこれらに限定されない。

15

本発明の発現カセットを目的とする植物に導入するためのベクターは、植物形質転換用ベクターが有用である。植物用ベクターとしては、植物細胞中で当該遺伝子を発現し、当該タンパク質を生産する能力を有するものであれば特に限定されないが、例えば、pBI221、pBI121（以上 Clontech 社製）、及びこれらから派生したベクターが挙げられる。また、特に単子葉植物の形質転換には、pIG121Hm、pTOK233（以上 Hiei ら、Plant J. , 6, 271-282 (1994)）、pSB424（Komari ら、Plant J. , 10, 165-174 (1996)）、スーパーバイナリーベクター pSB21 及びこれらから派生したベクターなどが例示される。これらの公知のベクターへ、当業者には周知の手順を用いてエリシタータンパク質をコードする遺伝子を導入する（必要であれば、プロモーター領域を組み換える）ことにより、本発明の発現カセットを有する組換えベクターを構築することがで

20

25

きる。例えば、スーパーバイナリーベクターpSB21 に hrpZ 遺伝子を組み込むことにより、構成的プロモーターと hrpZ 遺伝子とを含む発現カセットを有する組換えベクターを構築することができる。この組換えベクターから、既存のプロモーターを除去し、誘導的プロモーターを組み込むことにより、誘導的プロモーターと hrpZ 遺伝子とを含む発現カセットを有する組換えベクターを構築することができる。

植物形質転換用ベクターは、少なくともプロモーター、翻訳開始コドン、所望の遺伝子（本願発明の DNA 配列又はその一部）、翻訳終始コドン及びターミネーターを含んでいることが好ましい。また、シグナルペプチドをコードする DNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の 5' 側及び 3' 側の非翻訳領域、選抜マーカー領域などを適宜含んでいてもよい。マーカー遺伝子の例としては、テトラサイクリン、アンピシリン、又はカナマイシン若しくはネオマイシン、ハイグロマイシン又はスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等の他、ルシフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS)、グリーンフルオレッセンスプロテイン (GFP)、 $\beta$ -ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 等が挙げられる。

植物への遺伝子導入法としては、アグロバクテリウムを用いる方法 (Horsch et al. , Science, 227, 129 (1985)、Hiei et al. , Plant J. , 6, 271-282 (1994))、リーフディスク法 (Horsch et al. , Science, 227, 1229-1231 (1985))、エレクトロポレーション法 (Fromm et al. , Nature, 319, 791 (1986))、PEG 法 (Paszkowski et al. , EMBO J. , 3, 2717 (1984))、マイクロインジェクション法 (Crossway et al. , Mol. Gen. Genet. , 202, 179 (1986))、微小物衝突法 (McCabe et al. , Bio/Technology, 6, 923 (1988)) などが挙げられるが、所望の植物に遺伝子を導入する方法であれば特に限定されない。これらの導入法の中で好ましくは、ベクターを接合操作等を利用してアグロバクテリウム内に移し、このアグロバクテリウムを植物に感染させることによる。感染させるための方法も、当業者には周知である。例えば、植

物体の一部を傷つけ、そこに細菌を感染させる方法、植物体の胚組織（未熟胚を含む。）に細菌を感染させる方法、カルスに感染させる方法、プロトプラストと細菌を共培養する方法、又は葉組織の小片を細菌とともに培養する方法（リーフディスク法）がある。

5

得られた形質転換細胞は、適当なマーカーを指標とするか、又は所望の形質を発現しているか否かによって他の細胞から選択することができる。形質転換細胞をさらに従来技術を利用して分化させることにより、目的の形質転換植物体とすることができる。

10

得られた形質転換体の解析は、当業者に周知の種々の方法を用いて行うことができる。例えば、導入した遺伝子の DNA 配列を基にオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、これを用いた PCR により形質転換植物の染色体 DNA を解析することができる。また、導入した遺伝子に対応する mRNA や、タンパク質の発現の有無により解析することができる。さらには、植物体の外観（例えば、局部壊死斑を生じうるタンパク質をコードする遺伝子を導入した場合は、局部壊死斑の有無、又は局部壊死斑の大きさ、数等）、病害抵抗性（例えば、病原菌と接触させた場合の抵抗性の有無、又その程度）等によっても解析することができる。

15

20 本発明の形質転換植物においては、防御反応を誘導するために有効な量のエリシタータンパク質を、構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に発現しうる。防御反応を誘導するために有効な量とは、発現したエリシタータンパク質が、植物に、少なくとも局所的に防御関連反応（例えば、過敏感細胞死（局所壊死）の誘導）を引き起こさせることができる量をいう。好ましくは、局所のみならず、  
25 防御反応が全身に拡大し、結果として植物全体が抵抗性（全身獲得抵抗性）になる量である。また、好ましくは、局部壊死斑が非常に大きくなった結果、壊死斑の生じた局所組織が枯死してしまう量には満たない量である。

また、本発明の形質転換植物においては、エリシタータンパク質は、通常は発

- 現していないか発現していたとしても少量であるため植物の生育を著しく妨げることはなく、病原菌の侵入等の刺激があったときに、防御反応を誘導するために有効な量で発現されることが好ましい。例えば、エリシタータンパク質として  $\text{harpin}_{\text{pss}}$  を用いた場合に、通常、 $\text{harpin}_{\text{pss}}$  は発現していないか発現していたとしてもその器官が枯死するほどには局部壊死斑が生じない程度であり、病原菌が侵入したときに過敏感反応を生じる量で発現されるのが好ましい。さらには、病原菌が侵入し、 $\text{harpin}_{\text{pss}}$  が蓄積しても、局部壊死斑は肉眼ではほとんど観察されないが、全身的に抵抗性となる量で発現されるのが好ましい。
- 5
- 10      このような適切な防御反応を生じさせるためには、例えば、誘導的に遺伝子を発現させることができるプロモーターを用いることである。したがって、本発明の一つの実施の形態においては、誘導的プロモーターと、 $\text{harpin}$  遺伝子とが組み合わせられる。
- 15      また適切な防御反応は、誘導的プロモーターを用いた場合のみならず、構成的プロモーターを用いた場合であっても達成可能である。したがって、本発明の他の形態においては、構成的プロモーターと  $\text{harpin}$  とが組み合わせられる。このような場合、適切な防御反応が生じる機序としては、例えば、 $\text{harpin}_{\text{pss}}$  等のエリシタータンパク質は、植物細胞の細胞膜外側又は細胞壁で認識されているために、細胞質に蓄積している  $\text{harpin}_{\text{pss}}$  等は、菌の侵入による細胞の崩壊が起こるまで植物細胞に認識されず、結果として病原菌接種の後に過敏感反応が生ずる、あるいは  $\text{harpin}_{\text{pss}}$  等のエリシター活性には病原菌接種に起因する他の何らかの因子が介在すると推論される。
- 20
- 25      本発明の形質転換植物は、構成的又は誘導的プロモーター、該プロモーターにより制御される  $\text{harpin}_{\text{pss}}$  等のエリシタータンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを用いて形質転換された、うどんこ病耐性形質転換タバコ、あるいは構成的プロモーター、該プロモーターにより制御される  $\text{harpin}_{\text{pss}}$  等のエリシタータンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを用いて形質転換された、



いもち病耐性形質転換イネを含む。

本発明は、後述の実施例に記載されているタバコ、イネ以外の植物にも適用可能であると考えられる。このような植物として、農作物ではコムギ、オオムギ、  
5 ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、ソルガム、ワタ、ヒマワリ、ピーナッツ、  
トマト、ジャガイモ、サツマイモ、エンドウ、ダイズ、アズキ、レタス、キャベツ、  
カリフラワー、ブロッコリー、カブ、ダイコン、ホウレンソウ、タマネギ、  
ニンジン、ニンニク、ナス、カボチャ、キュウリ、リンゴ、ナシ、メロン、イチゴ、  
10 ブドウなどが、観賞用植物としてはシロイヌナズナ、ペチュニア、キク、カーネーション、セントポーリア、ヒャクニチソウなどが挙げられる。また、本明細書で「形質転換植物」というときは、本発明の方法により組換え植物細胞を得て、該植物細胞を植物体に再生させることにより得た形質転換植物 ( $T_0$  世代) のみならず、該形質転換植物より得られた後代 ( $T_1$  世代等) の植物をも、その病害抵抗性の形質が維持されている限り含む。また、本明細書で「植物」という  
15 ときは、特に明記した場合を除き、植物体 (個体) の他、種子 (発芽種子、未熟種子を含む)、器官又はその部分 (葉、根、茎、花、雄蕊、雌蕊、それらの片を含む)、植物培養細胞、カルス、プロトプラストを含む。

次の実施例において解析した病害はタバコうどんこ病とイネいもち病であるが、  
20 タバコの他の病害として野火病、立枯れ病、TMV などが、イネの他の病害として紋枯病、白葉枯病などが挙げられ、本発明の病害抵抗性植物の作出方法によりこれら病害にも抵抗性を付与できる可能性は充分にあると考えられる。

## 実施例

### 25 実施例 1. HrpZ 遺伝子のクローニング

既報の *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 株の *hrpZ* 遺伝子 (He et al. : Cell 73 : 1255-1266 (1993)、及び特表平 8-510127) の塩基配列を参考に、そのオープンリーディングフレームを増幅させるための一組のプライマー

Hrp1 : AAA ATC TAG AAT GCA GAG TCT CAG TCT TAA

Hrp2 : AAA AGT CGA CTC AGG CTG CAG CCT GAT TGC

- を合成した。これらのプライマーを用いて、ライラック枝枯細菌病菌 (Pseudomonas syringae pv. syringae LOB2-1) 由来の hrp クラスターを含むコスミドクローン (Inoue and Takikawa : J. Gen. Plant Pathol. 66 : 238-241 (2000)) の DNA を鋳型として、PCR を行った。PCR は反応溶液の量を 20  $\mu$ l とし、プライマー各 0. 5  $\mu$ M、dNTP 0. 2mM、1 $\times$ ExTaq バッファー、ExTaq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社) 1U、反応条件は 95℃で 5 分を 1 回行った後、94℃で 30 秒、60℃で 30 秒、72℃で 2 分を 30 回、72℃で 10 分間を 1 回行った。PCR 産物を、Takara ligation kit (宝酒造) を用いてベクター pCR2. 1 (invitrogen 社) にライゲーションし、大腸菌 TB1 株に形質転換した。PCR 産物の全塩基配列を決定した結果、全長 1029bp から成り、既報の hrpZ 遺伝子よりも 3 塩基 (1 アミノ酸分) 長く、DNA で 96. 7%、アミノ酸で 96. 5% の相同性を示した。両者の塩基配列が全く同一にならないのは pathovar 内の変異であると考えられた。クローニングした hrpZ 遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号 1 に、そこから得られるアミノ酸配列を配列番号 2 にそれぞれ示す。

## 実施例 2. 大腸菌内発現と抗体の作成

- pCR2. 1 に hrpZ 遺伝子が組み込まれた上記プラスミドを制限酵素 BamHI、SalI で消化、0. 7% アガロースで電気泳動して約 1. 1kb の断片を切り出した。
- この断片を同じ酵素で消化した発現ベクター pQE31 (キアゲン社) とライゲーションさせ、大腸菌 M15 株に形質転換した。こうして得られた大腸菌を LB 培地中で 1mM の IPTG 存在下で 37℃で培養を行うと、harpin<sub>ps</sub> が不溶性画分に蓄積する。ところがこのタンパク質はニッケルレジンの担体に吸着性が悪かったことから harpin<sub>ps</sub> の精製は次の手順で行った。HrpZ 遺伝子が pQE31 に組み込まれたベクターを有する大腸菌 M15 を 100mg/l のアンピシリン、25mg/l のカナマイシンを含む 2ml の LB 培地で 37℃で一晩培養し、更に 250ml の LB 培地に移して 3 時間程度培養後、1mM の IPTG を加えて更に 37℃で 4 時間培養を行った。遠心分離で集菌し、不溶性画分溶出バッファー (8M 尿素、0. 1M リン酸二水素ナトリウム、0. 01M Tris、pH 8. 0) 4ml で溶解し、遠心分離で上

清を得、0.1%のSDSを含む12.5%のアクリルアミドゲルで電気泳動後、ク  
ーマシーブリリアントブルーで染色し、40kDa付近に現れるバンドを切り出し  
た。ゲルを細片化し、溶出バッファー（1% SDS、0.02M Tris-HCl、pH 8.  
0）をゲルの容積の10倍量加え3日間振盪した。上清を分画分子量6-8,000の  
5 透析膜に移し、外液を80%アセトンとして透析を4時間で1回、一晚1回行っ  
た。透析チューブ内のものをすべてエッペンドルフチューブに移し、遠心して上  
清を捨て、ペレットをスピードバックで乾燥させて精製されたharpin<sub>ps</sub>を得た。  
精製したharpin<sub>ps</sub> 3mg相当をサワディ・テクノロジー社に送付し、抗体作成  
（ウサギ抗harpin<sub>ps</sub>血清）を依頼した。

10

### 実施例 3. 遺伝子構築と植物の形質転換

pCR2.1に組み込まれたhrpZ遺伝子を制限酵素XbaI、SacI（宝酒造社）消  
化によってベクターから切り出した。一方スーパーバイナリーベクターpSB21  
（35S-GUS-NOS, Komari et al. : Plant J. 10 : 165-174 (1996)）を同酵  
15 素で消化、GUS遺伝子を除去し、ここへhrpZ遺伝子を組み込んだ。以上の手  
順で、コンストラクト35S-hrpZ（35Sプロモーター-hrpZ遺伝子-NOSターミ  
ネーター）を構築した。カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターは構  
成的な高発現プロモーターであり、本コンストラクトで形質転換されたイネ、タ  
バコは全身にhrpZ遺伝子産物であるharpin<sub>ps</sub>を蓄積することが予想される。

20

pSB21を制限酵素HindIII、XbaI消化し35Sプロモーターを除去し、ここへ  
トウモロコシPPDKプロモーター0.9kb断片（Taniguchi et al. : Plant Cell  
Physiol 41 : 42-48 (2000)）を組み込んだ。完成したプラスミドをXbaI、SacI  
消化し、GUS遺伝子を除去した後、先述のhrpZ XbaI-SacI断片を挿入した。  
25 こうしてPPDK-hrpZ（PPDKプロモーター-hrpZ遺伝子-Nosターミネーター）  
を構築した。トウモロコシPPDKプロモーターは葉肉細胞など光合成器官  
で強発現をするプロモーターであり（Taniguchi et al. : Plant Cell Physiol  
41 : 42-48 (2000)）、本コンストラクトで形質転換されたイネは緑色器官（葉）  
にhrpZ遺伝子産物であるharpin<sub>ps</sub>を蓄積することが予想される。

PAL プロモーターは次の様にクローニングした。PSPAL1 (Yamada et al. : Plant Cell Physiol 35 : 917-926 (1994)、及び Kawamata et al. : Plant Cell Physiol 38 : 792-803 (1997)) を含むコンストラクト (PSPAL1 プロモーター-  
 5 GUS 遺伝子-NOS ターミネーター) を有するアグロバクテリウム LBA4404 株 (岡山大学、白石教授より譲受) よりプラスミド DNA を抽出した。一方、既報の PSPAL1 プロモーターの塩基配列 (Patent : JP 1993153978-A 1 22-JUN-1993;TAKASAGO INTERNATL CORP) を元に reverse プライマー

PALRVXba : GGG GTC TAG AAT TGA TAC TAA AGT AAC TAA TG  
 10 及び 2 つの Forward プライマー

PALFFHin : TTG GAA GCT TAG AGA TCA TTA CGA AAT TAA GG

PALFSHin : CTA AAA GCT TGG TCA TGC ATG GTT GCT TC

を設計した。PALRVXba と PALFSHin の組み合わせでは翻訳開始点上流およそ 0. 45kb (転写開始点上流およそ 0. 35kb) のプロモーター領域 (PAL-S) が、  
 15 PALRVXba と PALFFHin の組み合わせではおよそ 1. 5kb のプロモーター領域 (PAL-L) が増幅される。これらのプライマーを用いて上述のアグロバクテリウムのプラスミド DNA を鋳型に PCR を行った。PCR の反応条件は、反応溶液の量を 50  $\mu$ l とし、プライマー各 0. 5  $\mu$ M、dNTP 0. 2mM、1 $\times$ ExTaq バッファ一、ExTaq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社) 1U、反応条件は 94 $^{\circ}$ C で 3 分を 1  
 20 回行った後、94 $^{\circ}$ C で 1 分、50 $^{\circ}$ C で 1 分、72 $^{\circ}$ C で 2 分を 30 回、72 $^{\circ}$ C で 6 分間を 1 回行った。PCR 産物はベクター pCRII (invitrogen 社) にクローニングした。

PsPAL1 プロモーターは翻訳開始点から 142bp 上流に HindIII 部位を持つので、PAL-S を制限酵素 XbaI で完全消化した後、HindIII で部分消化し、0.  
 25 45kb 断片を pCRII から抜き出した。上述の pSB21 を HindIII、XbaI で消化し、35S プロモーターを除去し、ここへ PAL-S を組み込んだ。なおここで用いた pSB21 のベクターの骨格部分に存在する唯一の PvuII 部位は除去され、代わりに唯一の EcoRI 部位 (Nos ターミネーターの直後) へ PvuII リンカーが配置されている。PAL-S が組み込まれたプラスミドをさらに XbaI、SacI で消化し、

- GUS 遺伝子を除去した後、上述の hrpZ XbaI-SacI 1.1 kb 断片を挿入した。以上の手順で PALS-hrpZ を構築した。次に pCRII に組み込まれた PAL-L を制限酵素 XhoI、XbaI で消化し、1.45 kb PAL プロモーターを抜き出し、同酵素で二重消化したベクター pSB11 (Komari et al. : Plant J. 10 : 165-174 (1996)) に組み込んだ。完成したプラスミドを XbaI、SmaI で消化し、ここへ PALS-hrpZ の XbaI-PvuII 断片 (hrpZ-Nos ターミネーター) を挿入した。こうして PALL-hrpZ を作成した。PAL プロモーターは構成的に低レベルの発現をするが、病原菌や傷害で強く誘導されるプロモーターであり (Yamada et al. : Plant Cell Physiol 35 : 917-926 (1994)、及び Kawamata et al. : Plant Cell Physiol 38 : 792-803 (1997))、PALS-hrpZ や PALL-hrpZ で形質転換されたタバコはこれらのストレスが生じた時に、その場所に、より多くの harpin<sub>ps</sub> が蓄積するものと予想される。この場合、PALL の方が PALS に比べてより多くの harpin<sub>ps</sub> が蓄積するものと予想される。
- 15 以上のように作成した 4 つのコンストラクト 35S-hrpZ、PALS-hrpZ、及び PALS-hrpZ、PALL-hrpZ (図 1 にまとめた) を含む大腸菌 LB392 株と、選抜マーカー遺伝子の組み込まれたベクター pSB4U (トウモロコシユビキチンプロモーター-ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (hptII) -NOS ターミネーター) を含むアグロバクテリウム LBA4404 株、さらにヘルパープラスミド pRK2013 を含む大腸菌 HB101 株を三菌系接合により hrpZ を含むコンストラクトを相同性組換えを利用してアグロバクテリウムへ導入した。

- タバコの形質転換はリーフディスク法 (Horsch et al. : Science 227 : 1229-1231 (1985)) により行った。温室で育成したタバコ品種 SR1 の葉を、70% エタノールで 30 秒間、5 倍に希釈したアンチホルミンで 5 分間滅菌処理し、滅菌水で 2 度洗浄後およそ 1cm 角に切り、これにアグロバクテリウム懸濁液を接種した。形質転換シュートの誘導・選抜時、及び発根時のハイグロマイシン濃度は、それぞれ 50 又は 100mg/ml、0 又は 50mg/ml とした。イネの形質転換は Hiei et al. : Plant J. 6 : 271-282 (1994)) の方法に従い、アグロバクテリウムを

用いて水稻品種月の光、コシヒカリの未熟胚由来カルスを形質転換した。

#### 実施例 4. 形質転換体の解析

##### (1) 形質転換タバコ

- 5 35S-hrpZ から 15 個体、PALS-hrpZ から 10 個体、PALL-hrpZ から 16 個体の再分化植物を得た。各コンストラクト間で際立った形質転換効率の差異は見られなかった。形質転換当代 ( $T_0$ ) でウェスタン分析を実施し、形質転換自殖次世代 ( $T_1$ ) でウェスタン分析及び病害のアッセイを行った。
- 10 1)  $T_0$  世代のウェスタン分析
 

4~5 葉期の形質転換タバコ、非形質転換タバコ (SR1) の葉 2x2cm を、0.1M HEPES-KOH pH7.5 バッファー中で乳鉢を用いてすり潰した。15000g で 10 分間遠心した後の上清をタンパクサンプルとした。タンパク質量は Bio-Rad Protein Assay kit (BIO-RAD 社) により定量した。およそ 20  $\mu$ g のタンパク
- 15 質を Laemmli らの方法 (Nature 227: 680-685 (1970)) に従い、SDS-PAGE 法により分画した。ゲルは 12.5% PAGEL (ATTO 社) を使用した。泳動後、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜 (millipore 社) に転写した。PVDF 膜は 0.5% スキムミルクを含む 1xTBS バッファー中で 30 分間処理した後、抗 harpin<sub>pss</sub> 血清を 1/1000 (v/v) 含む同バッファー中で室温で一晩振とうした。二
- 20 次抗体としては、ヤギ抗ウサギ IgG コンジュゲートペルオキシダーゼ標識 (MBL 社) 若しくはヤギ抗ウサギ IgG アルカリフォスファターゼコンジュゲート (BIO-RAD 社) を 1/1000 (v/v) の濃度で使用した。発色系は、それぞれ HRP Color Development Reagent (BIO-RAD 社)、alkaline phosphatase substrate kit II (Vector laboratories 社) を用いた。発現タンパク量は、濃度
- 25 の分かっている harpin<sub>pss</sub> サンプルの発色度合いと、デンストメーター (モデル GS-670、BIO-RAD 社) を用いて比較することにより算出した。 $T_0$  世代のウェスタン分析結果の一部を図 2 に示し、全結果を表 1 にまとめた。

発現量は、4 段階 (+++, ++, +, -) で示し、それぞれ総可溶性タンパク質の

0. 1%以上 (+++), 0. 05~0. 1% (++), 0. 05%以下 (+), 検出限界以下 (-) を表している。これは、後述する表 2、3 及び 4 においても同様である。

表 1. タバコ T<sub>0</sub> 世代のウェスタン分析の結果

コンストラクト	再分化個体数	harpin <sub>ps</sub> の発現量 <sup>a</sup>			
		-	+	++	+++ <sup>b</sup>
PALS-hrpZ	10	1	8	1	0
PALL-hrpZ	16	2	10	4	0
35S-hrpZ	15	6	2	1	6
SR1		3	0	0	0

5      <sup>a</sup>: 数値は各発現量を示した個体数を示す。

<sup>b</sup>: harpin<sub>ps</sub> の発現量を4段階(+++: 特に高発現、++: 高発現、+: 中程度~弱い発現、-: 検出限界以下)で示した。

10      PAL プロモーターを有するコンストラクトの場合、8 割以上の個体で harpin<sub>ps</sub> の蓄積が検出された。また予想通り PALL の方が PALS に比べて高発現個体 (++) の割合が多かった。一方、35S プロモーターを有するコンストラクトの場合は、15 個体中、6 個体で harpin<sub>ps</sub> が全く蓄積していなかったものの、半数近くの 7 個体において高発現個体を得られた。しかもうち 6 個体で非常に高い発現 (+++) を示した。興味深いことにこれら高発現個体の葉や茎、根あるいは花の器官における形態的变化は観察されず、また種子稔性もほとんどのもので正常であった。

## 2) T<sub>1</sub> 世代のウェスタン分析と病害抵抗性検定

20      T<sub>0</sub> 世代で harpin<sub>ps</sub> の蓄積量が高かった KH1-2 (PALS-hrpZ)、KC6-7 (PALL-hrpZ)、KC8-1 (PALL-hrpZ)、KK1-1 (35S-hrpZ)、KK3-8 (35S-hrpZ)、KK4-2 (35S-hrpZ)、KK4-3 (35S-hrpZ)、KK7-6 (35S-hrpZ) の計 8 系統について、うどんこ病菌 (*Erysiphe cichoracearum*) に対する反応を解析した。

25      T<sub>0</sub> 世代で harpin<sub>ps</sub> が高レベルに蓄積したタバコ個体を選抜し、その自殖後代

- (T<sub>1</sub>) の種子を得た。この種子を播き約 2 ヶ月間観察を続けたが、この期間に目に見える形態的な変化は特に生じず、T<sub>0</sub> 世代と同様に正常に生育し、葉の表面に過敏反応は見られなかった。その後 4~5 葉期の形質転換タバコの T<sub>1</sub> 世代に対してうどんこ病菌の噴霧接種を行い、病害抵抗性検定を試みた。1. 4×10<sup>6</sup> spores/ml のうどんこ病菌孢子懸濁液約 2L を 244 個体の組換え体及び 41 個体の原品種に対して噴霧接種した。その結果、接種後 4、5 日で形質転換体の下位葉に過敏反応様の局部壊死斑が誘導された (図 3A,B)。驚くべきことに PAL-hrpZ のみならず、構成的プロモーターを用いている 35S-hrpZ コンストラクトの場合においても、病原菌感染後に特異的な局部壊死斑が誘導された (図 3B)。
- 菌接種後 5 日目の局部壊死斑の出現頻度は、非形質転換体で 5%程度であったのに対し、35S-hrpZ ではその 6~14 倍 (30~71%)、PAL-hrpZ では 4~5 倍 (20~27%) であった (表 2) が、その後 PAL-hrpZ の場合、局部壊死斑数が徐々に増加した。これは PsPAL1 プロモーターが *Erysiphe cichoracearum* に反応したためであろうと推察された。harpin<sub>ps</sub> の蓄積量と局部壊死斑の形成度合いは、正の相関の傾向にあった (表 3) が、形質転換体の中には harpin<sub>ps</sub> の蓄積が少なくとも我々の実施したウェスタン分析では検出されなかった個体でも局部壊死斑の生じたものが例外的に存在した。

- 次にうどんこ病菌感染後に生じた局部壊死斑が病害抵抗性に関連しているのか否かを調べるため、接種後 11 日目のうどんこ病の病徴を調査した。その結果、非形質転換体の中にうどんこ病菌の菌糸の進展が抑えられている個体は存在しなかったのに対し、35S-hrpZ で 15~57%、PAL-hrpZ で 13~18%の個体は非形質転換体と比較して明らかに軽微な病徴を示した (図 4; 表 2)。局部壊死斑が生じた葉のみならず、生じていない中~上位葉もうどんこ病の蔓延が抑えられたのは全身獲得抵抗性 (SAR) が稼動したためであると考えられた。コットンブルー染色によりうどんこ病菌の菌糸を観察したところ、対照とした原系統である SR1 の罹病葉ではうどんこ病菌の菌糸が旺盛に伸長し葉の表面に広がっていたのに対し、形質転換体では葉の表面に吸器は形成されるものの、菌糸の伸長が抑制され、伸長が途中で停止した。本研究で用いたプロモーターは 35S (構成的)



と PAL (誘導性) であるが、PAL よりも 35S の方を用いた方が、局部壊死斑の出現頻度が高く、しかも少なくとも接種後 11 日目の調査では、病害抵抗性の強い個体が多く得られた (表 2)。ただし、35S プロモーターを用いた場合、いくつかの個体において病原菌に反応して形成された局部壊死斑が非常に大きくなり

5 (葉面積の 10% 以上を占める)、結果として下葉が枯死してしまう状況が観察された。また逆に  $\text{harpin}_{\text{ps}}_{\text{ss}}$  が蓄積した個体においても局部壊死斑が肉眼では観察されない場合があったが (表 2)、このような個体の中にうどんこ病に抵抗性となるものがあった (表 2 の局部壊死斑マイナスの個体のうちの、かつこの数の個体。 $\text{harpin}_{\text{ps}}_{\text{ss}}$  発現量はすべて++)。おそらく非常に微細な範囲で過敏感反応が生じたためであろうと考えられるが、このような個体を選抜することで実用性の高い病害抵抗性植物を得られると考えられる。 $\text{hrpZ}$  を構成的プロモーターで転写制御した場合でも病原菌の侵入がないと局部壊死斑が生じないということは、 $\text{harpin}_{\text{ps}}_{\text{ss}}$  が植物細胞の細胞膜外側又は細胞壁で認識されているために、おそらく細胞質に蓄積している  $\text{harpin}_{\text{ps}}_{\text{ss}}$  が、菌の侵入による細胞の崩壊が起こる

10 まで植物細胞に認識されず、結果として病原菌接種のあとに過敏感反応を生じた、という推論が可能である。あるいは  $\text{harpin}_{\text{ps}}_{\text{ss}}$  のエリシター活性には、病原菌接種に起因する、又は病原菌若しくは植物に由来する他の何らかの因子の存在あるいは誘導が必要であるのかも知れない。

15

表2. タバコ T<sub>1</sub> 世代の harpin<sub>psa</sub> 蓄積量、局部壊死斑の形成および病害抵抗性の関係

系統名	コンストラクト	発現量(T <sub>0</sub> )	解析個体数(T <sub>1</sub> )
KH1-2	PALS- <i>hrpZ</i>	++	18
KC6-7	PALL- <i>hrpZ</i>	++	43
KC8-1	PALL- <i>hrpZ</i>	++	44
KK1-1	35S- <i>hrpZ</i>	+++	23
KK3-8	35S- <i>hrpZ</i>	+++	33
KK4-2	35S- <i>hrpZ</i>	++	35
KK4-3	35S- <i>hrpZ</i>	+++	7
KK7-6	35S- <i>hrpZ</i>	+++	41
SR1	(Control)	-	41

系統名	局部壊死斑の生じた個体数 (うち病斑の進展が遅れた個体数)				局部壊死斑 の生じた 個体の割合 (接種 5 日目)	病斑の進展 が遅れた 個体の割合 (接種 11 日目)
	+++	++	+	- <sup>a</sup>		
KH1-2(PALS)	0	0	5(3)	13(0)	27%	16%
KC6-7(PALL)	0	1(1)	8(6)	34(1)	20%	18%
KC8-1(PALL)	0	1(0)	11(5)	32(1)	27%	13%
KK1-1(35S)	0	0	7(3)	16(1)	30%	17%
KK3-8(35S)	0	2(0)	11(5)	20(0)	39%	15%
KK4-2(35S)	1(1)	4(3)	15(6)	15(0)	57%	28%
KK4-3(35S)	0	3(3)	2(1)	2(0)	71%	57%
KK7-6(35S)	1(1)	4(4)	18(4)	18(1)	56%	24%
SR1(Control)	0	0	2(0)	39(0)	5%	0%

<sup>a</sup>: 局部壊死斑の出現度合いを4段階(+++: 非常に多い、++: 多い、+: 少ない、-: なし)で示した。

5

表3. タバコ T<sub>1</sub> 世代における harpin<sub>psa</sub> の発現量と局部壊死斑数の関係

harpin <sub>psa</sub> 発現量 <sup>a</sup> (ウェスタン分析)	局部壊死斑の出現度合 <sup>b</sup>				局部壊死斑出現率
	+++	++	+	-	
+++	1	4	19	19	56%
++	0	5	32	77	32%
+	1	6	18	38	40%
-	0	1	5	18	25%
SR1	0	0	2	39	5%

<sup>a</sup>: harpin<sub>psa</sub> の発現量を4段階(+++: 特に高発現、++: 高発現、+: 中程度～弱い発現、-: 検出限界以下)で示した(SR1 は-)。

<sup>b</sup>: 局部壊死斑の出現度合いを4段階(+++: 非常に多い、++: 多い、+: 少ない、-: なし)で示した。

10

## (2) 形質転換イネ

1)  $T_0$  世代のウェスタン分析

品種月の光に  $harpin_{ps}$  を導入した。35S- $hrpZ$  から 35 個体、PPDK- $hrpZ$  から 26 個体の再分化植物を得た。各コンストラクト間で際立った形質転換効率の  
5 差異は見られなかった。形質転換当代 ( $T_0$ ) でウェスタン分析を実施し、高発現  
個体を選抜した。

再分化した形質転換イネ (月の光) から上記のタバコの場合と同じ方法でタンパク質を抽出し、ウェスタン分析を実施した。 $T_0$  世代のウェスタン分析の結果を  
10 表 4 に示す。

表 4. イネ (月の光)  $T_0$  世代のウェスタン分析の結果

コンストラクト	再分化個体数	$harpin_{ps}$ の発現量 <sup>a</sup>			
		-	+	++	+++ <sup>b</sup>
35S- $hrpZ$	35	17	5	13	0
PPDK- $hrpZ$	26	9	13	4	0

<sup>a</sup>: 数値は各発現量を示した個体数を示す。

<sup>b</sup>:  $harpin_{ps}$  の発現量を 4 段階 (+++: 特に高発現、++: 高発現、+: 中程度～弱い発  
15 現、-: 検出限界以下) で示した。

イネ (月の光) の場合もタバコの場合と同様に  $harpin_{ps}$  が高発現する個体が得られた (図 2 も参照)。35S プロモーターを有するコンストラクトの場合は、約半数の個体で  $harpin_{ps}$  の蓄積が検出され、さらに高発現個体 (++) の割合が  
20 全体の 1/3 以上であった。PPDK プロモーターの場合も、およそ 2/3 の個体で  $harpin_{ps}$  の蓄積が検出され、うち 4 個体で高発現であった。興味深いことにこれら高発現個体の葉、根あるいは花の器官における形態的变化は観察されなかった。また種子稔性もほとんどのもので正常であったので、高発現個体の  $T_1$  種子を得ることが出来た。

25

2)  $T_0$  世代のウェスタン分析と  $T_1$  世代の病害抵抗性検定

次に日本の最重要品種コシヒカリに  $harpin_{ps}$  を導入した。表 5 に  $T_0$  における

ウェスタン分析の結果を示す。

表5. イネ(コシヒカリ)T<sub>0</sub>世代のウェスタン分析の結果

コンストラクト	再分化個体数	harpin <sub>psa</sub> の発現量 <sup>a</sup>			
		-	+	++	+++ <sup>b</sup>
35S-hrpZ	78	18	33	21	6
PPDK-hrpZ	27	7	13	7	0

<sup>a</sup>: 数値は各発現量を示した個体数を示す。

- 5      <sup>b</sup>: harpin<sub>psa</sub>の発現量を4段階(+++:総可溶性葉タンパク質に対して0.5%以上の蓄積量、++:0.1~0.5%の蓄積量、+:0.01~0.1%の蓄積量、-:検出限界以下)で示した。

- 35S-hrpZ が導入された T<sub>0</sub> 世代の個体のうち harpin<sub>psa</sub> 蓄積量が非常に高かった (表 5 の+++ ) 個体 4 つ (hrp5-8、hrp23-5、hrp24-1、hrp42-9) を選  
 10      び、それらの T<sub>1</sub> 世代におけるイネいもち病に対する罹病度を調査した。選抜された 4 つの高発現個体の種子稔性は正常で、多くの自殖種子を得ることが出来た。T<sub>1</sub> 種子を培土を入れたシードリングケースに 8 粒×2 列で撒き、温室内で栽培し、4.8~5.2 葉期になったところで病害検定に供試した。イネいもち病菌  
 15      (*Magnaporthe grisea*) はレース 007 を用いた。接種にはいもち菌をオートミール・スクロース寒天培地上で培養 (28℃暗条件) し、菌叢蔓延後、25℃で 3 日間近紫外光照射して形成させた分生胞子を用いた。いもち菌の接種は、0.02% Tween20 で 1.5×10<sup>5</sup> 個の分生胞子/ml に調整した懸濁液をシードリングケース 3 つ当たり 30ml 噴霧接種することにより行なった。噴霧接種を行なったイネ  
 20      は接種後 24 時間加湿恒温器 (SLPH-550-RDS、日本医化器械製作所製) 内で 25℃、100%湿度条件下に保持した後、温室内へ移した。温室の設定条件は、明条件 25℃-16 時間、暗条件 22℃-8 時間とした。病害抵抗性の評価は、接種 6 日後における接種時の最上位展開葉 (第 5 葉) の進展性病斑数を目視で数えることにより行なった。結果については Mann-Whitney U 検定により有意差検定処理を  
 25      行なった。

その結果、いもち菌接種によって局部壊死斑は観察されなかったものの、

harpin<sub>ps</sub> 導入イネ 4 系統中 3 系統 (hrp5-8、hrp42-9、hrp23-5) において、平均進展性病斑数が対照のコシヒカリに比べ、24-38%減少していた。しかもこの減少は、統計的に有意な減少であった (表 6)。以上の結果は harpin<sub>ps</sub> 導入により、イネの病害抵抗性を増強させることが出来ることを示すものである。

5

表 6. Harpin<sub>ps</sub> 導入イネ(T<sub>1</sub>世代)4 系統のイネいもち病に対する病害検定の結果

系統	供試個体数	平均進展性病斑数 <sup>a</sup> (標準誤差)	有意差検定 <sup>b</sup>
hrp5-8	16	9.3 (± 1.0)	危険率 1%で有意
hrp23-5	21	11.4 (± 1.3)	危険率 5%で有意
hrp24-1	20	14.4 (± 1.4)	有意差なし
hrp42-9	14	9.4 (± 1.4)	危険率 1%で有意
コシヒカリ	64	15.0 (± 0.7)	-

<sup>a</sup>: 接種 6 日後の第 5 葉の結果。

<sup>b</sup>: Mann-Whitney U 検定によるコシヒカリに対する有意差検定。

- 10 本発明により、harpin をコードする遺伝子を構成的プロモーター又は誘導性プロモーターに接続、植物に導入することにより、その植物に病害抵抗性を付与できることが初めて明らかとなった。この harpin 導入植物は、タンパク質性エリシターである harpin の作用機作を解明する上で、また局部、全身獲得抵抗性の機構を解明する上で役立つと考えられる。また誘導性のプロモーターを用いなければ困難であろうと従来考えられていた harpin 導入による抵抗性植物の作出を、構成的プロモーターを用いても充分適用可能であることを示し、本アプローチの適用範囲の拡大を示すことが出来た。Harpin をコードする DNA 配列を、植物細胞の中で機能しうる適当な構成的、器官・時期特異的、あるいはストレスや病虫害で誘導されるプロモーター配列と、植物細胞で機能しうるターミネター
- 15
- 20 配列の発現カセットに組み込み、植物細胞に導入、再生個体を得ることにより、病害抵抗性植物を作出するという方法は、もはや遺伝子工学的に可能かつ有効なアプローチであることを本発明は示した。

## 請 求 の 範 囲

1. 構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーター及び該プロモーターにより制御されるエリシタータンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを用いて形質転換され、防御反応を誘導するために有効な量のエリシタータンパク質を、構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に発現しうる、病害抵抗性形質転換植物。
2. 構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーター及び該プロモーターにより制御されるエリシタータンパク質をコードする遺伝子が、ゲノムに組み込まれている、請求項 1 に記載された病害抵抗性形質転換植物。
3. エリシタータンパク質が、病害微生物に対する過敏感反応を誘導する活性を有するタンパク質である、請求項 1 又は 2 に記載された病害抵抗性形質転換植物。
4. 過敏感反応を誘導する活性を有するタンパク質が、次のいずれかである、請求項 3 に記載された病害抵抗性形質転換植物：
- (a) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- (b) 配列表の配列番号 2 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質；又は
- (c) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 50%以上の相同性を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質。
5. エリシタータンパク質をコードする遺伝子が、次のいずれかの DNA からなる遺伝子である、請求項 2 に記載された病害抵抗性形質転換植物：
- (a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA；

(b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA ; 又は

(d) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と少なくとも 50% 以上の相同性を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA。

10

6. 次の工程を含む、防御反応を誘導するために有効な量のエリシタータンパク質を、構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に発現しうる病害抵抗性形質転換植物を作出する方法 :

(a) 構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーター及び該プロモーターにより制御されるエリシタータンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを用いて、組換え植物細胞を得る工程 ; 並びに

(b) 該植物細胞を植物体に再生させる工程。

20 7. 防御反応を誘導するために有効な量のエリシタータンパク質を、構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に発現しうる病害抵抗性形質転換植物を作出するための、少なくとも次のものを含む発現カセット :

(a) 構成的、誘導的、器官特異的又は時期特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーター ; 及び

25 (b) 該プロモーターにより制御されるエリシタータンパク質をコードする遺伝子。

8. エリシタータンパク質が、病害微生物に対する過敏反応を誘導する活性を有するタンパク質である、請求項 7 に記載された発現カセット。

9. 過敏反応を誘導する活性を有するタンパク質が、次のいずれかである、請求項 8 に記載された発現カセット：

- (a) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 5 (b) 配列表の配列番号 2 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質；又は
- (c) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 50% 以上の相同性を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質。

10

10. エリシタータンパク質をコードする遺伝子が、次のいずれかの DNA からなる遺伝子である、請求項 7 に記載された発現カセット：

- (a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA；
- (b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA；
- 15 (c) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA；又は
- 20 (d) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と少なくとも 50% 以上の相同性を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA。

11. 全身獲得性の病害抵抗性形質転換植物を作出するための、請求項 7～10  
25 のいずれか 1 項に記載された発現カセット。

12. 防御反応を誘導するために有効な量のエリシタータンパク質が、病害微生物感染時特異的に発現される、請求項 7～11 のいずれか 1 項に記載された発現カセット。



13. 構成的プロモーター又は器官特異的若しくは時期特異的プロモーターを含む、請求項 12 に記載された発現カセット。

- 5      14. 請求項 7～13 のいずれか 1 項に記載された発現カセットを含む、組換えベクター。

15. 次のいずれかの DNA からなる遺伝子：

- (a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA ；
- 10      (b) 配列表の配列番号 1 において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質をコードする DNA ；
- (c) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ過敏反
- 15      応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA ；又は
- (d) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と少なくとも 50% 以上の相同性を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA。

- 20      16. 次のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子：

- (a) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質 ；
- (b) 配列表の配列番号 2 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質 ；又は
- 25      (c) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97% 以上の相同性を有し、かつ過敏反応誘導活性を有するタンパク質。

17. 次の何れかのタンパク質：

- (a) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質 ；

(b) 配列表の配列番号 2 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質；又は

- (c) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 97%以上の相同性を有し、かつ過敏感反応誘導活性を有するタンパク質。
- 5

18. 構成的又は誘導的プロモーターを含む発現カセットを用いて形質転換され、うどんこ病耐性形質転換タバコである、請求項 1~5 のいずれか 1 項に記載された病害抵抗性形質転換植物。

10

19. 構成的プロモーターを含む発現カセットを用いて形質転換され、いもち病耐性形質転換イネである、請求項 1~5 のいずれか 1 項に記載された病害抵抗性形質転換植物。



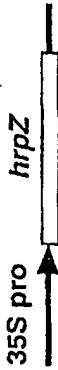
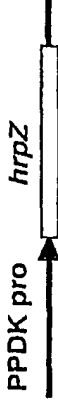
Construct name	Inducible/ Constitutive	Contents of the construct	Plants which the construct was introduced
PALL-hrpZ	Inducible		Tobacco
PALS-hrpZ	Inducible		Tobacco
35S-hrpZ	Constitutive		Rice, Tobacco
PPDK-hrpZ	Constitutive		Rice, Tobacco

図1. 植物に導入したコンストラクト

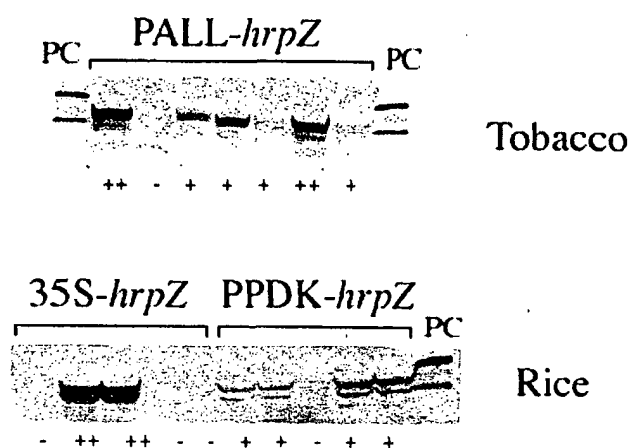
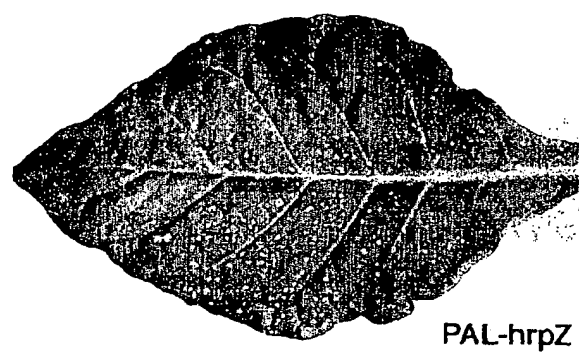


図2. harpin<sub>pss</sub>のタバコ、イネにおける発現



A



B

図 3. 過敏感反応様の局部壊死斑の生成

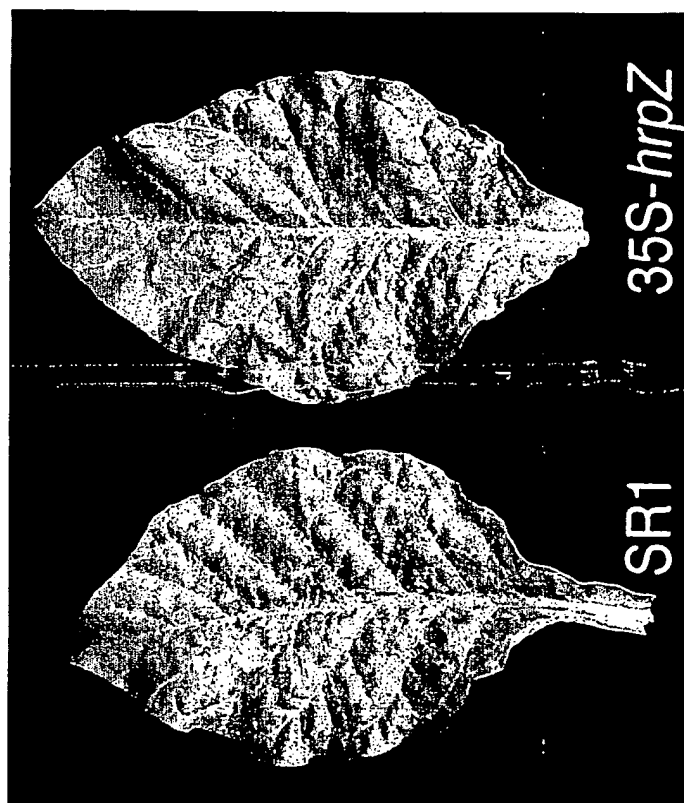


図4. うどんこ病菌に対する抵抗性

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Tobacco Inc.

&lt;120&gt; 病害抵抗性植物及びその作出方法

&lt;130&gt; YCT-640

&lt;150&gt; JP 2000-271413

&lt;151&gt; 07.09.2000

&lt;160&gt; 2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1029

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pseudomonas syringae pv. syringae LOB2-1

&lt;400&gt; 1

atg cag agt ctc agt ctt aac agc agc tcg ctg caa acc ccg gca atg 48

Met Gln Ser Leu Ser Leu Asn Ser Ser Ser Leu Gln Thr Pro Ala Met

1 5 10 15

gcc ctt gtc ctg gta cgt cct gaa acc gag acg act ggc gcc agt acg 96

Ala Leu Val Leu Val Arg Pro Glu Thr Glu Thr Thr Gly Ala Ser Thr

20 25 30

tcg agc aag gcg ctt cag gaa gtt gtc gtg aag ctg gcc gag gaa ctg 144

Ser Ser Lys Ala Leu Gln Glu Val Val Val Lys Leu Ala Glu Glu Leu

35 40 45

atg cgc aat ggt caa ctc gac gac agc tcg cca ttg ggc aaa ctg ctg 192

Met Arg Asn Gly Gln Leu Asp Asp Ser Ser Pro Leu Gly Lys Leu Leu

50 55 60

gcc aag tcg atg gcc gcg gat ggc aag gca ggc ggc ggt atc gag gat	240
Ala Lys Ser Met Ala Ala Asp Gly Lys Ala Gly Gly Gly Ile Glu Asp	
65                      70                      75                      80	
gtc atc gct gcg ctg gac aag ctg att cat gaa aag ctg ggt gac aac	288
Val Ile Ala Ala Leu Asp Lys Leu Ile His Glu Lys Leu Gly Asp Asn	
85                      90                      95	
ttc ggc gcg tct gcg gac aac gcc tcg ggt acc gga cag cag gac ctg	336
Phe Gly Ala Ser Ala Asp Asn Ala Ser Gly Thr Gly Gln Gln Asp Leu	
100                      105                      110	
atg act cag gtg ctc agt ggc ctg gcc aag tct atg ctc gat gat ctt	384
Met Thr Gln Val Leu Ser Gly Leu Ala Lys Ser Met Leu Asp Asp Leu	
115                      120                      125	
ctg acc aag cag gat ggc ggg gca agc ttc tcc gaa gac gat atg ccg	432
Leu Thr Lys Gln Asp Gly Gly Ala Ser Phe Ser Glu Asp Asp Met Pro	
130                      135                      140	
atg ctg aac aag atc gcg cag ttc atg gat gac aat ccc gca cag ttt	480
Met Leu Asn Lys Ile Ala Gln Phe Met Asp Asp Asn Pro Ala Gln Phe	
145                      150                      155                      160	
ccc aag ccg gac tcg ggt tcc tgg gtg aac gaa ctc aag gaa gac aac	528
Pro Lys Pro Asp Ser Gly Ser Trp Val Asn Glu Leu Lys Glu Asp Asn	
165                      170                      175	
ttc ctt gat ggc gac gaa acg gct gcg ttc cgc tcg gca ctc gac atc	576



Phe Leu Asp Gly Asp Glu Thr Ala Ala Phe Arg Ser Ala Leu Asp Ile  
 180 185 190

att ggc cag caa ctg ggt aat cag cag agt ggc gct ggc ggt ctg gcg 624  
 Ile Gly Gln Gln Leu Gly Asn Gln Gln Ser Gly Ala Gly Gly Leu Ala  
 195 200 205

ggg acg ggt gga ggt ctg ggc act ccg agc agt ttt tct aac aac tcg 672  
 Gly Thr Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro Ser Ser Phe Ser Asn Asn Ser  
 210 215 220

tcc gtg acg ggt gat ccg ctg atc gac gcc aat acc ggt ccc ggt gac 720  
 Ser Val Thr Gly Asp Pro Leu Ile Asp Ala Asn Thr Gly Pro Gly Asp  
 225 230 235 240

agc ggc aat agc agt ggt gag gcg ggg caa ctg atc ggc gag ctt atc 768  
 Ser Gly Asn Ser Ser Gly Glu Ala Gly Gln Leu Ile Gly Glu Leu Ile  
 245 250 255

gac cgt ggc ctg caa tcg gta ttg gcc ggt ggt gga ctg ggc aca ccc 816  
 Asp Arg Gly Leu Gln Ser Val Leu Ala Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro  
 260 265 270

gta aac acc ccg cag acc ggt acg gcg gcg aat ggc gga cag tcc gct 864  
 Val Asn Thr Pro Gln Thr Gly Thr Ala Ala Asn Gly Gly Gln Ser Ala  
 275 280 285

cag gat ctt gac cag ttg ctg ggc ggc ttg ctg ctc aag ggc ctt gaa 912  
 Gln Asp Leu Asp Gln Leu Leu Gly Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Glu

290                      295                      300  
 gcg acg ctc aag gat gcc ggt caa acc gct acc gac gtg cag tcg agc    960  
 Ala Thr Leu Lys Asp Ala Gly Gln Thr Ala Thr Asp Val Gln Ser Ser  
 305                      310                      315                      320  
 gct gcg caa atc gcc acc ttg ctg gtc agt acg ctg ctg caa ggc acc    1008  
 Ala Ala Gln Ile Ala Thr Leu Leu Val Ser Thr Leu Leu Gln Gly Thr  
 325                      330                      335  
 cgc aat cag gct gca gcc tga    1029  
 Arg Asn Gln Ala Ala Ala  
 340  
 <210> 2  
 <211> 342  
 <212> prt  
 <213> Pseudomonas syringae pv. syringae LOB2-1  
 <400> 2  
 Met Gln Ser Leu Ser Leu Asn Ser Ser Ser Leu Gln Thr Pro Ala Met  
 1                      5                      10                      15  
 Ala Leu Val Leu Val Arg Pro Glu Thr Glu Thr Thr Gly Ala Ser Thr  
 20                      25                      30  
 Ser Ser Lys Ala Leu Gln Glu Val Val Val Lys Leu Ala Glu Glu Leu  
 35                      40                      45  
 Met Arg Asn Gly Gln Leu Asp Asp Ser Ser Pro Leu Gly Lys Leu Leu

50                      55                      60

Ala Lys Ser Met Ala Ala Asp Gly Lys Ala Gly Gly Gly Ile Glu Asp  
65                      70                      75                      80

Val Ile Ala Ala Leu Asp Lys Leu Ile His Glu Lys Leu Gly Asp Asn  
85                      90                      95

Phe Gly Ala Ser Ala Asp Asn Ala Ser Gly Thr Gly Gln Gln Asp Leu  
100                      105                      110

Met Thr Gln Val Leu Ser Gly Leu Ala Lys Ser Met Leu Asp Asp Leu  
115                      120                      125

Leu Thr Lys Gln Asp Gly Gly Ala Ser Phe Ser Glu Asp Asp Met Pro  
130                      135                      140

Met Leu Asn Lys Ile Ala Gln Phe Met Asp Asp Asn Pro Ala Gln Phe  
145                      150                      155                      160

Pro Lys Pro Asp Ser Gly Ser Trp Val Asn Glu Leu Lys Glu Asp Asn  
165                      170                      175

Phe Leu Asp Gly Asp Glu Thr Ala Ala Phe Arg Ser Ala Leu Asp Ile  
180                      185                      190

Ile Gly Gln Gln Leu Gly Asn Gln Gln Ser Gly Ala Gly Gly Leu Ala  
195                      200                      205

Gly Thr Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro Ser Ser Phe Ser Asn Asn Ser  
210 215 220

Ser Val Thr Gly Asp Pro Leu Ile Asp Ala Asn Thr Gly Pro Gly Asp  
225 230 235 240

Ser Gly Asn Ser Ser Gly Glu Ala Gly Gln Leu Ile Gly Glu Leu Ile  
245 250 255

Asp Arg Gly Leu Gln Ser Val Leu Ala Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro  
260 265 270

Val Asn Thr Pro Gln Thr Gly Thr Ala Ala Asn Gly Gly Gln Ser Ala  
275 280 285

Gln Asp Leu Asp Gln Leu Leu Gly Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Glu  
290 295 300

Ala Thr Leu Lys Asp Ala Gly Gln Thr Ala Thr Asp Val Gln Ser Ser  
305 310 315 320

Ala Ala Gln Ile Ala Thr Leu Leu Val Ser Thr Leu Leu Gln Gly Thr  
325 330 335

Arg Asn Gln Ala Ala Ala  
340

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> A01H5/00, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> A01H5/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/36697 A (BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF KENTUCKY),	1-3, 6-8, 11-14
Y	21 November, 1996 (21.11.96), Full text; all drawings, & JP 11-505423 A	4, 5, 9, 10, 18, 19
X	WO 94/26782 A (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.),	15-17
Y	24 November, 1994 (24.11.94), Full text; all drawings, & JP 8-510127 A	4, 5, 9, 10, 18, 19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 December, 2001 (04.12.01)

Date of mailing of the international search report  
18 December, 2001 (18.12.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A01H5/00, C12N15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A01H5/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 96/36697 A (BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF KENTUCKY), 21. 11月. 1996 (21. 11. 96), 全文, 全図 & JP 11-505423 A	1-3, 6-8, 11-14 4, 5, 9, 10, 18, 19
X Y	WO 94/26782 A (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.), 24. 11月. 1994 (24. 11. 94), 全文, 全図 & JP 8-510127 A	15-17 4, 5, 9, 10, 18, 19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 12. 01

国際調査報告の発送日

18.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2B

9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3237